

PCT/JP99/04249

09/762188

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT 4

20.09.99

REC'D 01 OCT 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年 8月 5日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第222170号

出願人

Applicant(s):

住友製薬株式会社

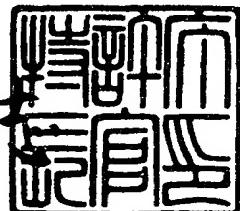
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 8月 20日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建



出証番号 出証特平11-3058392

【書類名】 特許願
【整理番号】 132497
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 38/18
【発明の名称】 肝実質細胞増殖因子投与用製剤
【請求項の数】 13
【発明者】
【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内
【氏名】 永野 智一
【発明者】
【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内
【氏名】 森 育枝
【発明者】
【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内
【氏名】 河村 敬夫
【発明者】
【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内
【氏名】 泰地 瞳夫
【発明者】
【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内
【氏名】 野口 浩
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府茨木市蔵垣内1丁目3番45号 住友製薬株式会社内

【氏名】 谷 俊輔

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市戸塚内1丁目3番45号 住友製薬株式会
社内

【氏名】 前田 弘雄

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100107629

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 敏夫

【電話番号】 06-466-5214

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056546

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9710701

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 肝実質細胞増殖因子投与用製剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 肝実質細胞増殖因子（HGF）を有効成分とし、投与部位局所の組織及びその近傍組織に有効量の該因子を移行・分布・作用させ、且つ、投与部位以外の血液中、全身の組織への移行・分布・作用を減少できる製剤。

【請求項2】 虚血性疾患又は動脈疾患を治療又は予防するための、請求項1記載の製剤。

【請求項3】 投与部位が筋肉である、請求項1又は2記載の筋肉内投与用製剤。

【請求項4】 投与部位が皮下又は表皮である、請求項1又は2記載の皮下投与用製剤、外用剤又はハップ剤。

【請求項5】 投与部位が骨格筋、心筋である、請求項1、2又は3記載の筋肉内投与用製剤。

【請求項6】 投与部位である筋肉組織への移行・分布・作用が、血液、肝臓及び腎臓への移行・分布・作用を凌駕することを特徴とする、請求項1、2、3又は5記載の製剤。

【請求項7】 肝実質細胞増殖因子（HGF）を有効成分として含有する製剤の同量を静脈内へボーラス投与した時と比較し、血液、肝臓及び腎臓における最大濃度が100分の1以下であり、投与部位である筋肉組織内濃度が50倍以上であることを特徴とする、請求項1、2、3、5又は6記載の筋肉内投与用製剤。

【請求項8】 肝実質細胞増殖因子（HGF）を有効成分として含有する製剤の同量を静脈内へボーラス投与した時と比較し、血液、肝臓及び腎臓におけるAUCが5分の1以下であり、投与部位である筋肉組織内AUCが10倍以上であることを特徴とする、請求項1、2、3、5又は6記載の筋肉内投与用製剤。

【請求項9】 肝実質細胞増殖因子（HGF）を有効成分として含有し、且つ、HGFを結合・吸着する物質を含有しないことを特徴とする、請求項1～

8 いずれか記載の製剤。

【請求項10】 心臓または四肢の虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するための、請求項1、2、3、5、6、7、8又は9記載の筋肉内投与用製剤。

【請求項11】 心臓または四肢の虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するための投与部位が患部及びその周辺の筋肉局所である、請求項1、2、3、5、6、7、8又は9記載の筋肉内投与用製剤。

【請求項12】 動脈疾患が閉塞性動脈硬化症である、請求項1～11いずれか記載の製剤。

【請求項13】 虚血性疾患が虚血性心疾患である、請求項1～11いずれか記載の製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、肝実質細胞増殖因子（HGF）を有効成分として含有し、虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するための、投与用製剤に関する。さらに詳しくは、心臓または四肢の虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するために、患部及びその周辺の筋肉局所部位に投与することからなる筋肉内投与用製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

肝実質細胞増殖因子（HGF）は成熟肝細胞に対する強力な増殖促進因子として発見され、その遺伝子クローニングがなされたタンパク質である（Biochemical Biophys Res Commun, 122, 1450 (1984)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6489, (1986)、FEBS Letter, 22, 231 (1987)、Nature, 342, 440 (1989)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3200 (1991)）。その後の研究により、HGFはin vivoにおいて肝再生因子として障害肝の修復再生に働くだけでなく、血管新生作用を

有し、虚血性疾患や動脈疾患の治療または予防に大きな役割を果たしていることが明らかとなってきた (Symp. Soc. Exp. Biol., 47 cell behavior, 227-234 (1993), Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 1937-1941 (1993), Circulation, 97, 381-390 (1998))。すなわち、ウサギの下肢虚血モデルにおいてHGFを投与すると、顕著な血管新生が見られ血流量の改善、血圧減少の抑制、虚血症状の改善が生じたとの報告がなされている。これらの報告により、今日では、血管新生因子の一つとしてHGFが発現、機能していると考えられるようになった。

【0003】

このようにHGFは血管新生因子の機能を始めとして種々の機能を持っており、医薬品として活用するための色々な試みがなされてきた。しかし、ここで問題となってきたのがHGFの血中での半減期である。HGFの半減期は約10分と短く、血中濃度を維持することが困難であり、また、HGF有効量の患部への移行性が問題となった。

【0004】

しかし、以上のように種々の動物モデルを用いたHGFの薬効評価により、虚血性疾患あるいは動脈疾患に対するHGFの有効性が明らかにされているものの、具体的なHGFの有効な投与法あるいは投与量等については、未だ結論が出されていない。

【0005】

一般的にタンパク性製剤の場合は静脈内への投与が多いことが常識となっており、前記虚血性疾患モデルに対するHGFの投与に関しては、例えば静脈や動脈内への投与の例が示されている (Circulation, 97, 381-390 (1998))。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、HGFを有効成分として含有し、虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するための、筋肉内投与用の製剤を提供することを目的とする。本発明

の筋肉内投与用製剤は、例えば障害部位である心臓、四肢の虚血部位の筋肉内に直接投与されるため、投与されたHGFの利用効率が高く、静脈内投与と比較して投与量が低減できる。さらに、投与部位である筋肉から、血液中、投与部位の筋肉組織及びその周辺の組織を除いた全身への移行、分布、作用が少ないため、副作用を軽減でき、より安全性の高いものであるという効果を有する。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らはHGFを虚血性疾患あるいは動脈疾患に適応するにあたり、投与量、投与法の検討を銳意行ってきた。上記疾患に対するHGFの投与法として、静脈内ボーラス投与、静脈内持続投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与などの方法を想定して検討を行ってきた。HGFの静脈内ボーラス投与等に関しては評価系が確立しているのに対し、筋肉内投与については文献も含めて情報がほとんどなく、またHGFの体内動態についても報告を見出すことができなかった。このように、虚血性疾患モデルや動脈疾患モデルに対して筋肉内投与を試みた報告はなされておらず、従ってHGFの筋肉内投与が有効であるか否かについては今まで全く明らかにされていなかった。

【0008】

本発明者らはラットを用いて、下肢虚血部位に対する筋肉内投与の体内動態と、他の投与経路（静脈内投与）の体内動態とを比較検討した。その結果、図1に示されるように筋肉内投与の場合には、静脈内投与した場合と比較し、投与したHGFが筋肉内で非常に高い濃度で維持され、血清中への移行は低かった。即ち、投与部位の筋肉内から循環血中への移行率は約7%と低く、この低い移行率は反対側の下肢筋肉中のHGF濃度が低いままであることと良く対応することを見出した。また、HGFを皮下投与した場合にも、筋肉内投与と同様に投与部位でのHGF濃度が高く維持され、投与部位から循環血中への移行率は低いものであった。

一方、HGFを静脈内持続投与した場合には、血中のHGF濃度が高く維持されるのに対して筋肉内におけるHGF濃度は極端に低いことが見出された。即ち、例えば、図1の $600\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 群に示されるように血清中ではHGF

濃度が 536 ng/ml となるのに対し、筋肉中には HGF が 10 ng/g tissue 未満しか存在しなかった。このことから、虚血患部及びその周辺の筋肉又はそこに存在する血管に HGF を作用させようとした場合には、静脈内投与では効率が悪く、患部もしくはその周辺の筋肉内に直接投与することが有効であることを、初めて明らかにした。

【0009】

また、HGF の筋肉内投与と静脈内ボーラス投与とを比較したところ、筋肉内投与では、血液、肝臓及び腎臓における最大濃度が静脈内ボーラス投与の場合の 100 分の 1 以下、より好適には 1000 分の 1 以下となることを見出した。さらに、筋肉内投与では、投与部位の筋肉組織内濃度が静脈内ボーラス投与の場合の 50 倍以上、より好適には 200 倍以上となることが見出された。

さらに、血液、肝臓及び腎臓における AUC を筋肉内投与と静脈内ボーラス投与とで比較したところ、筋肉内投与では、血液、肝臓及び腎臓における AUC が静脈内ボーラス投与の 5 分の 1 以下、より好適には 10 分の 1 以下となることを見出した。さらに、投与部位の筋肉組織内 AUC は、筋肉内投与では、静脈内ボーラス投与の 10 倍以上、より好適には 20 倍以上となることが見出された。

【0010】

以上のように HGF の筋肉内投与は患部の投与部位で効率的に高い HGF 濃度が維持される等の優れた体内動態を示すことが明らかとなったが、この効果をさらに発揮させるためには、コンドロイチン硫酸などの細胞外基質を構成するプロテオグリカン及びそれらを成分として含む蛋白キャリアーを含有しない HGF 製剤が望ましいことが明らかとなった。即ち、図 6 に示されるように、コラーゲンを基質として作製したミニペレットからの HGF の放出に対するコンドロイチン硫酸配合の影響を検討したところ、コンドロイチン硫酸を配合した HGF 含有ミニペレットでは、コンドロイチン硫酸を配合せずアラニンを配合した HGF 含有ミニペレットと比較し、ミニペレットからの HGF の放出が速いことを見出した。すなわち、コンドロイチン硫酸などの細胞外基質を構成するプロテオグリカンを配合しない HGF 製剤の方が、HGF の放出が遅いことを示している。このことは上記のように、コンドロイチン硫酸などの細胞外基質を構成するプロテオグ

リカンを含有しないHGF製剤の方が、投与局所の組織において保持され易く、血液を介する全身の他の臓器への移行、分布を抑えることができる所以である。

【0011】

一方、ラットなどを用いた体内動態の検討から、投与したHGFは主に肝臓からクリアランスされることが報告されており (Am. J. Physiol. 263, G642 (1992))、ヘパリンなどを配合することにより、肝臓を介するクリアランスが抑制され、血中動態の推移が延長することが知られている (Hepatology, 20, 417, (1994))。しかしながら、本発明において初めて提示したコンドロイチン硫酸などの細胞外基質を構成するプロテオグリカンを配合しないHGF製剤は、投与局所から血中、他の臓器への移行性を抑えることができる一方、血中に移行したHGFのクリアランスを抑制しないので、他の臓器への移行性、反応性をさらに抑制し、投与部位である筋肉における有効性を高めることができる所以である。

本発明の投与用製剤は、HGFに結合・吸着する物質を含有しないことが特徴である。HGFを吸着・結合する物質としては、例えば、細胞外基質（マトリックス）の構成成分である糖、糖蛋白、糖脂質、複合糖質などが挙げられる。より具体的には、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ヘパリン様物質などが挙げられる。硫酸基などを含む糖、糖蛋白、糖脂質、複合糖質など、HGFに結合・吸着する物質も同様である。また、生体構成成分に限定されず、上記、糖、糖蛋白、糖脂質、複合糖質の一部分を含むことにより、HGFに吸着・結合する物質も同様である。さらに、HGFを吸着・結合する物質としては、蛋白製剤に使用される蛋白質、糖蛋白質などの蛋白キャリアーまたはそれらに含有されるHGFに結合・吸着する物質も含まれる。HGFを吸着・結合する物質として、蛋白キャリアーに微量に含有されるHGFに結合・吸着する物質もこの範疇に含まれる。

また、蛋白製剤において、pHやイオン強度、イオン濃度などの条件、あるいは化学修飾などにより、タンパク質の重合の割合などの物性が異なることが知られている。この様なタンパク質の物性の違いも、筋肉などの投与した組織における本発明の投与用製剤の保持、血中への移行性に影響する。

【0012】

以上のように筋肉内投与により、患部の投与部位に HGF が高濃度で維持されることが分かったが、この筋肉組織内の HGF が患部の組織や血管に移行して、HGF としての作用を本当に果たしているかが問題であった。そこで、HGF が患部の組織や血管に移行してリン酸化が見られるか否かを指標としてチェックし、HGF が機能しているかどうかを確認した。例えば、図 7 に示されるように 30~3000 μg/kg の HGF をラット筋肉内に投与した場合、筋肉組織では HGF の受容体である c-Met の Tyr 残基がリン酸化を受け、活性化されていることが分かる。これとは対照的に、肝臓や腎臓組織では、無処置群と比し、c-Met は全く活性化されていない。このことは、投与した筋肉組織において HGF はその作用を発揮し、肝臓や腎臓においては作用を示さないことを意味している。

【0013】

さらに本発明者らは HGF の筋肉内投与による有効性を確認するため、閉塞性動脈硬化症 (ASO) の動物モデルを用いて検討を行った。即ち、ラット下肢虚血モデルを用いて前記筋肉内投与を行った場合、下肢の虚血障害がどのように改善されるかを検討した。検討方法として、下肢の皮膚表面温度をサーモグラフィーを用いて測定し、皮膚表面温度の低下抑制を指標に筋肉内投与の効果を確認した。その結果、この筋肉内投与により虚血下肢における皮膚表面温度の低下が抑制されることを見出した。これは、HGF が持つ血管新生作用により、虚血下肢の血行動態が改善され温度の低下が抑制されたことを示している。

以上のように、ASO モデルに対する、HGF の筋肉内投与の有効性が初めて明らかとなった。さらにサーモグラフィーを用いて有効性が確認できたことは、即ち、臨床の ASO 患者、特に軽症の段階から自覚症状として虚血下肢の冷感を持つ患者に対しても効果を示せるということであり、初期の ASO 患者から、重症な ASO 患者までこの HGF の筋肉内投与を使用し治療が可能になったことを示すものである。このことは、虚血による下肢の切断等が必要になる重症な ASO に進行する前に、軽症の段階で ASO の治療が出来ることも可能にするものである。このことは、現在有効な治療方法がまだない、大勢の軽症の ASO 患者に

とって、病状の進行を抑制、改善・回復できるという画期的な治療法になることが示されたものである。

【0014】

本発明は以上のような知見に基づいてなされたものである。従って本発明は、

- (1) HGF を有効成分とし、投与部位局所の組織及びその近傍組織に有効量の該因子を移行・分布・作用させ、且つ、投与部位以外の血液中、全身の組織への移行・分布・作用を減少できる製剤、
- (2) 虚血性疾患又は動脈疾患を治療又は予防するための、前記(1)記載の製剤、
- (3) 投与部位が筋肉である、前記(1)又は(2)記載の筋肉内投与用製剤、
- (4) 投与部位が皮下又は表皮である、前記(1)又は(2)記載の皮下投与用製剤、外用剤又はハップ剤、
- (5) 投与部位が骨格筋、心筋である、前記(1)、(2)又は(3)記載の筋肉内投与用製剤、
- (6) 投与部位である筋肉組織への移行・分布・作用が、血液、肝臓及び腎臓への移行・分布・作用を凌駕することを特徴とする、前記(1)、(2)、(3)又は(5)記載の製剤、
- (7) HGF を有効成分として含有する製剤の同量を静脈内ヘボーラス投与した時と比較し、血液、肝臓及び腎臓における最大濃度が100分の1以下であり、投与部位である筋肉組織内濃度が50倍以上であることを特徴とする、前記(1)、(2)、(3)、(5)又は(6)記載の筋肉内投与用製剤、
- (8) HGF を有効成分として含有する製剤の同量を静脈内ヘボーラス投与した時と比較し、血液、肝臓及び腎臓におけるAUCが5分の1以下であり、投与部位である筋肉組織内AUCが10倍以上であることを特徴とする、前記(1)、(2)、(3)、(5)又は(6)記載の筋肉内投与用製剤、
- (9) HGF を有効成分として含有し、且つ、HGFを結合・吸着する物質を含有しないことを特徴とする、前記(1)～(8)いずれか記載の製剤、
- (10) 心臓または四肢の虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するた

めの、前記(1)、(2)、(3)、(5)、(6)、(7)、(8)又は(9)記載の筋肉内投与用製剤、

(11) 心臓または四肢の虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するための投与部位が患部及びその周辺の筋肉局所である、前記(1)、(2)、(3)、(5)、(6)、(7)、(8)又は(9)記載の筋肉内投与用製剤、

(12) 動脈疾患が閉塞性動脈硬化症である、前記(1)～(11)いずれか記載の製剤、並びに

(13) 虚血性疾患が虚血性心疾患である、前記(1)～(11)いずれか記載の製剤、に関する。

【0015】

【発明の実施の形態】

本発明で使用されるHGFは公知物質であり、医薬として使用できる程度に精製されたものであれば、種々の方法で調製されたものを用いることができ、また既に市販されている製品（例えば、東洋紡Code No. HGF-101等）を使用してもよい。HGFの製造法としては、例えば、HGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養上清等から分離、精製して該HGFを得ることができる。あるいは遺伝子工学的手法によりHGFをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適当な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組換えHGFを得ることができる（例えばNature, 342, 440 (1989)、特開平5-111383号公報、Bioc hem. Biophys. Res. Commun. 163, 967 (1989)など参照）。上記の宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、酵母又は動物細胞などを用いることができる。このようにして得られたHGFは、天然型HGFと実質的に同じ作用を有する限り、そのアミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されていてもよく、また同様に糖鎖が置換、欠失及び／又は付加されていてもよい。

【0016】

本発明の筋肉内投与用製剤は、例えば前記虚血性疾患あるいは動脈疾患といっ

た、現在までに HGF の薬効が確認されている全ての循環器系の疾患に対して適用することができる。本発明において、HGF を有効成分として含有する製剤の治療、予防の対象となる疾患において、心疾患として、虚血性心疾患、心筋梗塞、急性心筋梗塞、心筋症、狭心症、不安定狭心症、冠動脈硬化、心不全などが含まれる。四肢虚血性疾患としては、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、血管損傷、動脈塞栓症、動脈血栓症、臓器動脈閉塞、動脈瘤などが含まれる。

その際、有効成分である HGF に対し、必要に応じて pH 調整剤、緩衝剤、安定化剤、保存剤、あるいは可溶化剤等を添加しても良い。投与量としては、症状、年齢、性別等によって異なるが、成人患者当たり約 0.05～約 20000 μg の範囲、好ましくは約 5～約 500 μg の範囲から投与量が選択され、これを患部またはその周辺の筋肉部位に注入することができる。

例えば、閉塞性動脈硬化症の虚血肢の診断においては、安静時疼痛、間歇性跛行、潰瘍の有無、トレッドミルを用いた歩行可能な距離の測定、ドップラー血流計等を用いた Ankle Pressure Index (下肢血圧と上腕血圧の比) の測定を行い、虚血肢、虚血領域を推定する。造影剤を用いた血管造影 (Angiography) 、Digital Subtraction Angiography, Magnetic Resonance Angiography などにより、血管の狭窄、閉塞部位を詳しく特定する。肢の状態の判定に関しては、例えば、Society for Vascular Surgery/ North American Chapter and International Society for Cardiovascular Surgery により推奨された標準書などに従う。血管造影などにより特定された虚血部位の筋肉及びその周辺の筋肉に対し、本発明の投与製剤を、その領域の大きさに応じて 1 ケ所から 20 ケ所、好ましくは 3 ケ所から 6 ケ所に分けて投与する。また、該投与を複数回行うことも可能である。

さらに本発明の筋肉内投与用製剤は、前記治療目的の他、予防のためにも使用することができる。

【0017】

【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

【0018】

実施例1

筋肉内投与によるHGF筋肉内濃度

(1)方法

フィッシャー系ラット用いて、HGFを0.3、1、3mg/kgで筋肉内投与した場合と、6、60、600μg/kg/hrで3時間静脈内持続投与した場合の血清、肝臓、腎臓、筋肉（投与部および対側）中HGF濃度を測定した。筋肉内投与は、エーテル麻酔下で、ラットの左大腿後部筋肉の中央部に行った。投与容量は1ml/kgとし、0.3M NaCl、0.03% Tween 80、5mg/ml L-alanineを含む10mMクエン酸緩衝液（pH 5.5）をvehicleとして用いた。HGF投与から5分、30分、2時間、8時間、24時間経過後、ラットから血清、肝左側葉、腎臓、筋肉（投与部および対側）を得た。静脈内持続投与はラットの尾静脈から行い、投与速度は0.07ml/hrとした。投与開始から3時間以上経過後に、同様に血清、肝左側葉、腎臓、筋肉を得た。血清中および各臓器中のヒトHGF濃度については、ヒトHGF測定用ELISAキットであるイムニスHGF EIA（特殊免疫研究所製）を用いて測定した。臓器中のHGFは、2M NaCl、1mM PMSF、1mM EDTA、0.1% Tween 80を含有する20mM Tris-HCl（pH 7.5）を抽出液として用い（筋肉：12ml/g tissue、肝臓・腎臓：8ml/g tissue）、1分間ホモジナイズした後、4℃、15,000rpmで60分間遠心分離し、抽出液中のHGF量を上述のELISAキットにて測定した。その際、スタンダード溶液についても、HGFを投与していないラットの臓器に既知濃度のHGFを添加し、同様に抽出した溶液を用いた。また、サンプルの希釈液についても、HGFを投与していないラットの臓器の抽出液を同様に調製して用いた。濃度推移の解析にはモーメント解析法を用いた。

【0019】

HGFを大腿部筋肉内に投与した後の筋肉におけるHGF濃度の推移について、図1に示す。HGFを尾静脈内へ持続投与した後の結果についても、併せて図1に示す。HGFを尾静脈から6、60μg/kg/hrで3時間持続投与した

ときの筋肉中濃度については測定限界 (1.5 ng/g tissue) 以下であった。 3 mg/kg で筋肉内投与した場合の筋肉中における薬物動態パラメータを表1に示した。投与部筋肉内におけるHGFの $t_{1/2}$ は10.6時間であり、投与24時間後においてもピーク時の約18%の濃度が維持されていた。HGFを尾静脈よりボーラス投与した場合も、例えば 0.3 mg/kg のHGFの投与により筋肉内に検出されるHGF濃度は、 10 ng/g tissue のオーダーである。

【0020】

【表1】

| 投与経路、投与量 | | 筋肉内投与、 3 mg/kg | |
|---|--------------------|--------------------------|--|
| 筋肉部位 | 投与部 | 対側 | |
| AUC($\text{hr} \cdot \text{ng/g tissue}$) (infinite) | 11.6×10^5 | 820 | |
| $t_{1/2}(\text{hr})$ | 10.6 | 11.2 | |
| Cmax(ng/g tissue) | 84.1×10^3 | 82.4 | |
| Tmax | 5min | 5min | |

【0021】

以上の図1および表1に示されるように、HGFを筋肉内投与した場合、投与した筋肉内で非常に高い濃度を示した。これらは、HGFが薬効を示すために十分すぎる濃度であると考えられた。一方、対側の筋肉内においては、投与部の約 $1/1000$ の濃度に留まった。図2に示されるように、HGFを筋肉内に投与した場合、血清中のHGF濃度は比較的低く推移し、投与部筋肉内から循環血中の移行率は6.7%と低かった。また、図3、4に示されるように、HGFを筋肉内投与した場合、肝臓、腎臓中のHGF濃度は静脈内投与した場合と比較して、極端に低かった。HGFを静脈内へ持続投与した後の血清中、肝臓、腎臓のHGF濃度の結果についても、併せて図2、3、4に示す。

【0022】

このように、HGFを静脈内に持続投与した場合、血清、肝臓、腎臓中のHGF濃度が高く持続されるのに対し、筋肉内におけるHGF濃度は極端に低かった。最高投与量である $600 \mu \text{g/kg/hr}$ 群を例に取ると、血清中では53.6

ng/ml の HGF が存在していたのに対し、筋肉中では $10 \text{ ng}/\text{g}$ と少なかった。このことから、虚血筋肉患部及びその周辺の筋肉又はそこに存在する血管に選択的に HGF を作用させる事を目的とした場合、静脈内投与では効率が悪く、局所筋肉内に直接投与する方が有効であると考えられた。また、HGF を筋肉内に投与する事により、肝臓、腎臓などの他の臓器には作用させずに、筋肉組織に選択的に HGF を作用させる事ができ得ると考えられた。

【0023】

実施例 2

ラット下肢虚血ASOモデルに対する筋肉内投与の薬効検討

(1) 方法

SD系ラット（9週齢、雄）を用いた。約 $50 \text{ mg}/\text{kg}$ のペントバルビタール（ダイナボット社製、ネンブタール）を腹腔内投与し、ラットを麻酔した。分枝を結紮した後、左大腿動脈を摘出し、ラット下肢虚血モデルを作成した。ラットをエーテルにより麻酔し、左大腿部内側の筋肉内に HGF または vehicle を投与した。大腿動脈摘出直後から投与を開始し、投与量 $1 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ 、投与容量 $1 \text{ ml}/\text{kg}/\text{day}$ 、1日1回、5日間投与した。vehicle として 0.3M NaCl , 0.03% Tween 80, $5 \text{ mg}/\text{ml}$ alamine, $10 \text{ mM Na-citrate buffer}$ (pH 5.5) を用いた。大腿動脈摘出から 14 日後に、ペントバルビタールによりラットを麻酔し、下肢周辺の毛を除毛クリームにて除毛した後、サーモグラフィー（日本アビオニクス社製）を用いて、大腿下部内側（図5の部位1）・下腿部内側（同部位2）・膝下外側（同部位3）・下腿前部外側（同部位4）・大腿下部外側（同部位5）・下腿部外側（同部位6）の6ヶ所の皮膚表面温度を、両下肢同時に測定した。それぞれの測定部位について、虚血肢温度から正常肢温度を引き、皮膚表面温度の差を算出した。

【0024】

(2) 結果

虚血肢と正常肢の皮膚表面温度の差を図5に示す。即ち、大腿動脈を摘出し、

vehicleを投与した群では、虚血肢の各部位において、正常肢と比べて0.8~1.7℃の温度低下が見られた。それに対して、HGFを投与した群においては、0.2~1.0℃の温度低下に抑えられていた。各部位毎に、温度低下を2群間で比較したところ、6ヶ所全ての部位において、HGF投与群の方が温度低下が小さい傾向が見られた。また、下腿部内側および大腿下部外側の2ヶ所においては、HGFの投与により有意に温度低下が抑制された。

【0025】

以上の図5から示されるように、ラット下肢虚血モデルを作製し、虚血肢の大腿部筋肉内にHGFを投与したところ、虚血肢における皮膚表面温度の低下が抑制された。これは、HGFが持つ血管新生作用により、虚血肢における血行動態が改善され、温度の低下が抑制されたと考えられる。

【0026】

実施例3

HGF含有ミニペレットからのin vitro HGF放出におけるコンドロイチン硫酸の影響

(1) アラニン10%含有のHGF含有ミニペレットの調製法

HGF含有量: 131.2 μg/mgミニペレット

HGF 65.3 mgを含有する水溶液6.9mlと1%アラニン水溶液4.4mlと蒸留水16mlおよび2%アテロコラーゲン16.7gを混合し、凍結乾燥した後、少量の蒸留水を加えて膨潤させ、練合し、均質な混合液にした。これを10mlのディスポーザブルシリングに入れ、10,000Gで60分間遠心脱泡した。これをシリングから押し出した後、乾燥し、切断することにより一本あたり 500 μg のHGFを含有する棒状のミニペレット（直径1.1mm、長さ4mm）を得た。

(2) コンドロイチン硫酸10%含有のHGF含有ミニペレットの調製法

HGF含有量: 132.8 μg/mgミニペレット

HGF 65.3 mgを含有する水溶液6.9mlと1.5%コンドロイチン硫酸ナトリウム水溶液2.9mlと蒸留水17mlおよび2%アテロコラーゲン16.7gを混合し、凍結乾燥した後、少量の蒸留水を加えて膨潤させ、練合し、

均質な混合液にした。これを10mlのディスポーザブルシリンジに入れ、10,000Gで60分間遠心脱泡した。これをシリンジから押し出した後、乾燥し、切断することにより一本あたり500μgのHGFを含有する棒状のミニペレット（直径0.9mm、長さ4mm）を得た。

【0027】

(3) *in vitro*放出試験

0.3% Tween 20を含むPBS(pH7.4)を放出液として用いた。37℃において、2mlの放出液中に上述の方法で調製したミニペレットを各々入れ、HGFの放出速度を測定した(n=2)。放出液中のHGF濃度については、ヘパリンアフィニティークロマトグラフ法にて測定した。

【0028】

実験結果を図6に示す。即ち、コンドロイチン硫酸含有のミニペレットからは、1日後にはほぼ100%のHGFが放出されたのに対し、コンドロイチン硫酸を含有しないアラニン含有ミニペレットからは緩やかにHGFが放出された。放出開始から7日後においても放出されたHGF量はミニペレット含有量の30%未満に留まった。これは、HGFと親和性を持つコンドロイチン硫酸などのプロテオグリカンとHGFを共存させる事により、HGFの放出を促進させ得る事を示す。また逆に、コンドロイチン硫酸などのプロテオグリカンを共存させない事により、放出を緩やかにし、投与部位に局所的にHGFを作用させ得る可能性を示す。

【0029】

実施例4

ラット筋肉内HGF投与後の各臓器におけるc-Metのリン酸化

(1)方法

SD系ラット(12週齢、雄)を用いて、筋肉内投与後の筋肉、肝臓、腎臓におけるc-Metのリン酸化について検討した。エーテル麻酔下でラットの左大腿後部筋肉内に3、0.3、0.03mg/kgのHGFを投与した。投与から5分、30分後にラットを脱血し、筋肉、肝臓、腎臓を摘出した。摘出した臓器にRIPA buffer(50mM Tris-HCl(pH7.4), 50m

M NaCl, 1% Triton X-100, 5mM EDTA, 10mM Na₄P₂O₇, 50mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 0.4mM AEBS F, 10μg/ml Leupeptin, 10μg/ml Aprotinin, 1μg/ml Pepstatin A)を5(筋肉)または8(肝臓、腎臓)mL/g tissue添加し、ポリトリロンを用いてホモジネートした。そして、16000 rpm、4℃、30分間遠心分離することにより沈殿を除いた。10mg(筋肉)または5mg(肝臓、腎臓)の蛋白を含む抽出液をRIPA bufferで1mLとし、50μl(約50%)のProtein G Sepharose(Pharmacia社)を加え、4℃で、2時間攪拌した。遠心により、Protein G Sepharoseを除き、その上清に1μgの抗c-Met抗体(Santa Cruz社)を加え、4℃で一晩攪拌した。さらに、20μlのProtein G Sepharoseを加え、4℃で2時間攪拌した。遠心により上清を除き、Protein G Sepharoseを1mLのRIPA bufferで3回洗浄した後、2×loading bufferを加え、100℃、5分間加熱し、7.5% SDS-PAGEに供した。泳動した蛋白はニトロセルロースフィルター上に電気的に転写、結合させた。フィルターは、3% BSAを含むTBS-T(10mM Tris-HCl(pH7.6), 150mM NaCl, 0.05% Tween 20)中で振とうすることにより、プロッキングした。TBS-Tで軽く洗浄後、1μg/mlの抗リン酸化チロシン抗体(Upstate Biotechnology社)を含むTBS-T中で、室温、1時間振とうした。さらにTBS-Tで洗浄後、2000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIg抗体(Amersham社)を含むTBS-T中で、室温、1時間振とうした。TBS-Tで洗浄後、ECLウエスタンブロット検出試薬(Amersham社)を用いて、リン酸化されたc-Metの検出を行った。

フィルターは、62.5mM Tris-HCl(pH6.7), 100mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS溶液中で、60℃、30分間振とうすることにより、デプローブし、TBS-Tで洗浄後、3% BSAを含むTBS-T中で振とうすることにより、プロッキングした。TBS-Tで軽

く洗浄後、 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗c-Met抗体を含むTBS-T中で、室温、1時間振とうした。さらにTBS-Tで洗浄後、2000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギIg抗体(Amersham社)を含むTBS-T中で、室温、1時間振とうした。TBS-Tで洗浄後、ECLウエスタンプロット検出試薬を用いて、c-Metの検出を行った。

【0030】

(2)結果

リン酸化c-Metに対するIP-Westernの結果を図7に示す。筋肉組織では、 $0.03\sim 3\text{mg}/\text{kg}$ の各投与量において、c-Metの著しいリン酸化が見られた。一方、肝臓および腎臓においては、HGF筋肉内投与によるc-Metのリン酸化は見られなかった。この事は、 $3\text{mg}/\text{kg}$ 以下のHGFを筋肉内に投与する事により、肝臓・腎臓に作用させる事無く、筋肉組織・筋肉組織中の血管に選択的にHGFを作用させ得る事を示している。

【0031】

製剤例1

生理食塩水 100ml 中にHGF 1mg 、マンニトール 1g 及びポリソルベート80 10mg を含む溶液を無菌的に調製し、 1ml ずつバイアルに分注した後、凍結乾燥して密封することにより凍結乾燥製剤を得た。

【0032】

製剤例2

0.02M リン酸緩衝液(0.15M NaCl 及び 0.01% ポリソルベート80含有、pH7.4) 100ml 中にHGF 1mg 及びヒト血清アルブミン 100mg を含む水溶液を無菌的に調製し、 1ml ずつバイアルに分注した後、凍結乾燥して密封することにより凍結乾燥製剤を得た。

【0033】

【発明の効果】

本発明により、HGFを有効成分として含有し、虚血性疾患あるいは動脈疾患を治療又は予防するための、筋肉内投与用製剤が提供される。本発明の筋肉内投与用製剤は、静脈内投与と比較して半減期が長く、筋肉内に維持されやすいこと

から、従来の静注等の投与量が低減でき、副作用が軽減されるという効果を有する。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、ラット大腿後部筋肉内にHGFを投与した後の筋肉中濃度推移を示す図である。

【図2】

図2は、ラット大腿部筋肉内にHGFを投与した後の血清中の濃度推移を示す図である。

【図3】

図3は、ラット大腿部筋肉内にHGFを投与した後の肝臓中の濃度推移を示す図である。

【図4】

図4は、ラット大腿部筋肉内にHGFを投与した後の腎臓中の濃度推移を示す図である。

【図5】

図5は、ラット下肢虚血モデルの皮膚表面温度に対するHGFの改善効果を示すグラフである。

【図6】

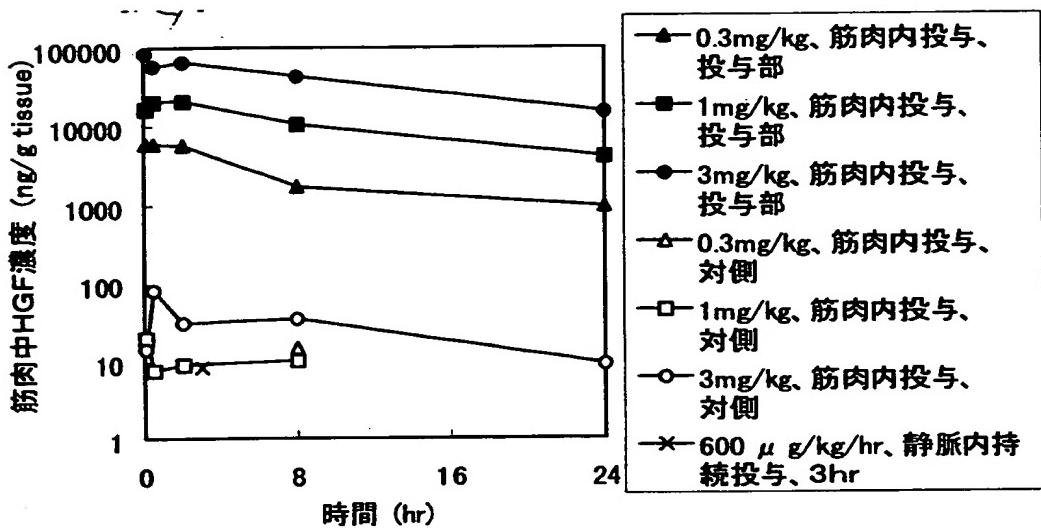
図6は、HGF含有コラーゲンミニペレットからのHGFの放出を示す図である

【図7】

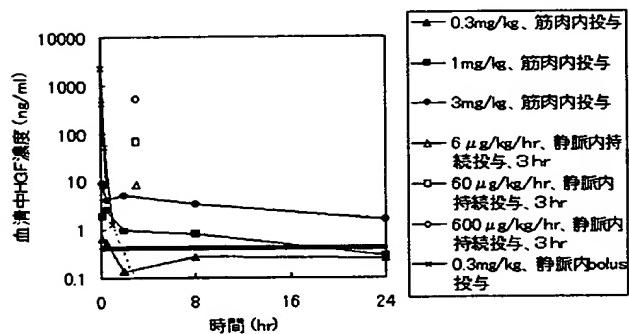
図7は、ラット大腿部筋肉内にHGFを投与した後の筋肉、肝臓、腎臓におけるc-Metのリン酸化を示す図である。

【書類名】 図面

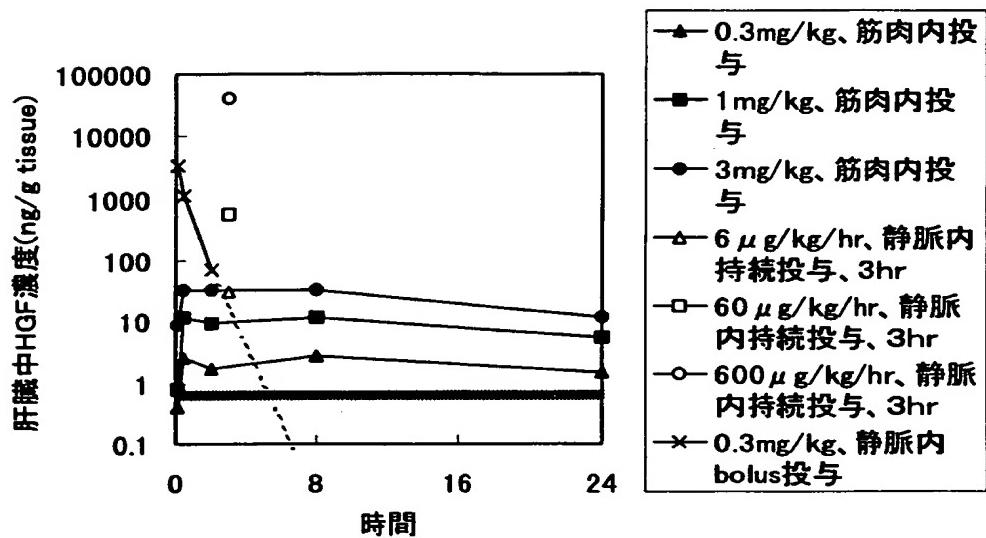
【図1】



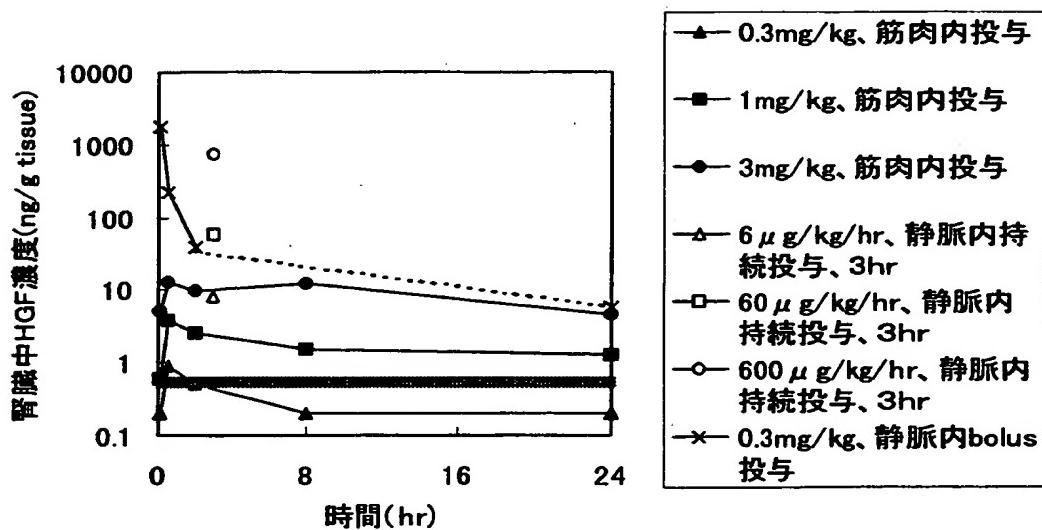
【図2】



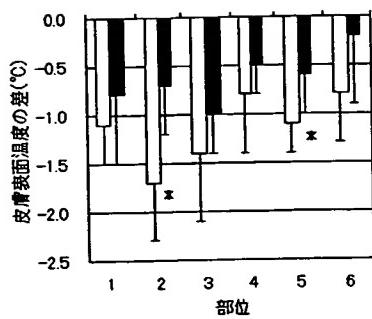
【図3】



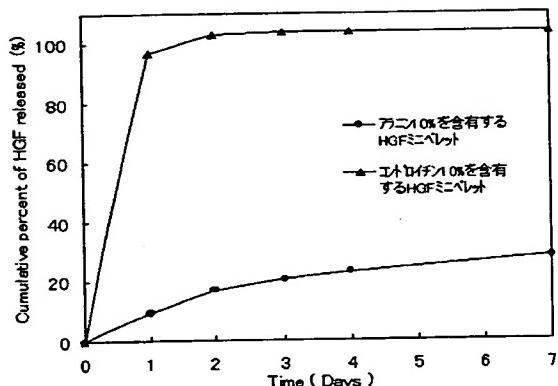
【図4】



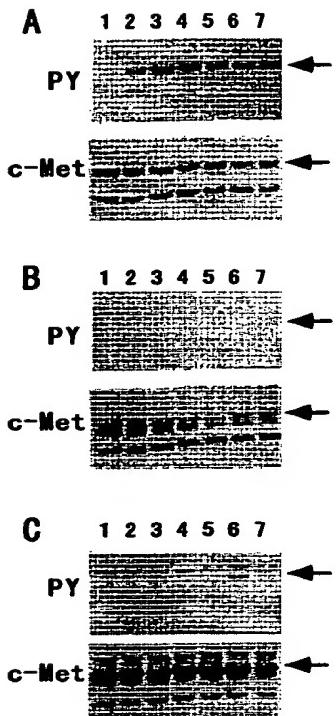
【図5】



【図6】



【図7】



A : 肌肉、B : 腎臓、C : 肝臓

1 : 無処置、2 : 0.03mg/kg HGF投与5分後、3 : 0.03mg/kg HGF投与30分後
 4 : 0.3mg/kg HGF投与5分後、5 : 0.3mg/kg HGF投与30分後
 6 : 3mg/kg HGF投与5分後、7 : 3mg/kg HGF投与30分後

PY:抗リン酸化Tyr抗体によるblotting
 c-Met:抗c-Met抗体によるblotting
 矢印は、c-Metの位置を示す。

【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 肝実質細胞増殖因子（HGF）を有効成分として含有し、虚血性疾患あるいは動脈疾患を治療又は予防するための、筋肉内投与用製剤。

【効果】 静脈内投与と比較して HGF が投与された患部の HGF 濃度が維持され半減期が長く、投与量が低減でき、副作用が軽減されるという効果を有する。

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成10年 8月 5日
【特許出願人】
【識別番号】 000183370
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号
【氏名又は名称】 住友製薬株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100107629
【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住
友製薬株式会社 法務部内
【氏名又は名称】 中村 敏夫

出願人履歴情報

識別番号 [000183370]

1. 変更年月日 1990年 8月 9日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

氏 名 住友製薬株式会社